

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-163685

(43)Date of publication of application : 20.07.1987

(51)Int.Cl.

C12N 1/38
A23C 9/13
C12P 19/00
//(C12N 1/38
C12R 1:01)
(C12P 19/00
C12R 1:465)

(21)Application number : 61-004234

(71)Applicant : DAINIPPON INK & CHEM INC

(22)Date of filing : 14.01.1986

(72)Inventor : NISHIBASHI HIDEJI
KATABAMI TADASHI
MATSUBAYASHI TADAO

(54) COMPOSITION FOR PROMOTING MULTIPLICATION OF BIFIDOBACTERIUM MOLD

(57)Abstract:

PURPOSE: A composition having improved multiplication promoting effects on Bifidobacterium mold, comprising laminarioligosaccharide as an active ingredient.

CONSTITUTION: A composition containing laminarioligosaccharide is obtained by treating a β -1,3-glucosyl saccharide compound with endo β -1,3-glucanase. A multiplication promoter for Bifidobacterium mold comprising the laminarioligosaccharide as an active ingredient. Curdlan, laminarin, pachyman, cell wall of yeast, etc., may be cited as the β -1,3-glucosyl saccharide compound. A bacterium belonging to the genus Streptomyces is preferable as the bacterium. The laminarioligosaccharide is a water-soluble saccharide wherein about 2W10 glucoses (G) are bonded by β -1,3 bond and laminaritrise or laminaritetraose is preferable as the laminarioligosaccharide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-163685

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)7月20日

C 12 N 1/38
 A 23 C 9/13
 C 12 P 19/00
 //(C 12 N 1/38
 C 12 R 1:01)
 (C 12 P 19/00
 C 12 R 1:465)

7115-4B
 8114-4B
 8515-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全7頁)

⑮ 発明の名称 ビフィドバクテリウム菌増殖促進組成物及びその製造法

⑯ 特 願 昭61-4234

⑰ 出 願 昭61(1986)1月14日

⑱ 発 明 者 西 橋 秀 治 市原市辰巳台西3-12-233
 ⑲ 発 明 者 方 波 見 忠 市原市辰巳台東4-4-547
 ⑲ 発 明 者 松 林 忠 男 千葉市小仲台4-3-18-605
 ⑳ 出 願 人 大日本インキ化学工業 東京都板橋区坂下3丁目35番58号
 株式会社
 ㉑ 代 理 人 弁理士 高橋 勝利

明 細 書

1. 発明の名称

ビフィドバクテリウム菌増殖促進組成物及び
 その製造法

2. 特許請求の範囲

1. ラミナリオリゴ糖を有効成分とするビフィ
 ドバクテリウム菌の増殖促進組成物。

2. 微生物が生産するエンド型 β -1,3-グルカナ
 ーゼにより β -1,3-グルコシル糖化合物を処理する
 ことを特徴としたビフィドバクテリウム菌増殖促
 進組成物の製造法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、新規なビフィドバクテリウム菌増殖
 促進組成物及びその製造法に関する。更に詳しく
 はラミナリオリゴ糖を有効成分としたビフィドバ
 クテリウム菌増殖促進組成物及び β -1,3-グルコシ
 ル糖化合物を特定の β -1,3-グルカナーゼで処理す
 ることを特徴としたビフィドバクテリウム菌増殖
 促進組成物の製造法に関する。

(従来の技術)

ビフィドバクテリウム菌は幼児から老人に至る
 までほとんどの人の腸内に定着しており、近年有
 益な様々の役割を演じていることが明らかになっ
 てきている。例えば、ビフィドバクテリウム菌の
 有用性を列挙すると以下のようなことがある。

1) 腸内有害菌の抑制、排除、2) 有機酸の産生、
 3) 便秘、下痢の改善 4) 蛋白質の吸収促進 5) ビタミ
 ンの産生 6) 抗ガン作用(食品工業 1下-1981 p.44-
 51) 等である。この為、ビフィドバクテリウム
 菌を含有させた牛乳、ヨーグルト等の飲食品が市
 販され、健康の維持、増進を目的として広く利用
 されるようになってきた。一方、最近腸内におけ
 るビフィドバクテリウム菌の増殖を促進させる物
 質をビフィドバクテリウム菌とともに、又は単独
 で投与することにより腸内ビフィドバクテリウム
 菌数を高水準に維持しようとする試みがなされビ
 フィドバクテリウム菌増殖因子としてラクチュロ
 ース、N-アセチルグルコサミン、パンテチン類
 等が知られているが、一方でビフィドバクテリウ

ム菌が選択的に質化し得る糖類の研究も多くなされている。

例えば合成オリゴ糖、コンニャクマンナン分解物及びフラクトオリゴ糖等。(「腸内フローラと食物因子」光岡知足編・学会出版センター刊より) またガラクトース-グルコースオリゴ糖(特開昭55-104885号公報)及び大豆オリゴ糖(特開昭60-66978号公報)が知られている。(問題を解決する為の手段)

しかしながら、本発明者らは、前記のような従来のビフィドバクテリウム増殖促進物質とはいずれとも異なる新規な促進物質について鋭意研究した結果、本発明に至った。

即ち、本発明は、ラミナリオリゴ糖を有効成分とするビフィドバクテリウム菌の増殖促進組成物及び~~ストレプトマイセス属に属する~~微生物が生産する¹³ エンド型 β -1,3-グルカナーゼにより β -1,3-グルコシル糖化合物を処理することを特徴としたビフィドバクテリウム菌増殖促進組成物の製造法を提供するものである。

有効成分として多く含む組成のものが好ましい。次に微生物が生産するエンド型 β -1,3-グルカナーゼの調製方法について述べる。反応に用いるエンド型 β -1,3-グルカナーゼは、 β -1,3-グルコシル糖化合物を加水分解し、ラミナリオリゴ糖を生成するものであればいずれの起源からのものでもよいが、ストレプトマイセス属に属する微生物からのものが好ましい。又通常市販の β -1,3-グルカナーゼも使用できなくはないが、エキソ型 β -1,3-グルカナーゼを混入している為、グルコースが多量に生成され、これではビフィドバクテリウム菌の選択糖源にならない。従って、イオン交換クロマトグラフィーあるいは分子ふるい等で両酵素を分画して使用すれば良い。本発明で特に好ましく用いられるストレプトマイセス属に属する微生物としては、例えばストレプトマイセス sp. DIC-108 が挙げられる。DIC-108 菌株は、培養液中にエンド型とエキソ型の両タイプの β -1,3-グルカナーゼを生産するが、エキソ型の β -1,3-グルカナーゼは過大な条件で加熱処理を行うことによりすみやかに失活

(発明の構成)

本発明の β -1,3-グルコシル糖化合物とは、カードラン〔アルカリゲネス属が生産する直鎖型 β -1,3-グルカン(A,B,C、29、757、'65又は発酵と工業36、2、'78)〕、ラミナリン、パキマン、酵母細胞壁及び天然の海藻類等が挙げられるが、その中でも直鎖型 β -1,3-グルカンであるカードランがより好ましい。

本発明のラミナリオリゴ糖とは、前記 β -1,3-グルコシル糖化合物をエンド型 β -1,3-グルカナーゼにより分解して得られるグルコース(G)が β -1,3-結合で2~10、好ましくは3~7個程度結合した水溶性の糖である。その具体例としては、ラミナリビオース(G_2)、ラミナリトリオース(G_3)、ラミナリテトラオース(G_4)、ラミナリペンタオース(G_5)、ラミナリヘキサオース(G_6)、ラミナリヘプタオース(G_7)、ラミナリオクタオース(G_8)、ラミナリノナオース(G_9)、ラミナリデカンオース(G_{10})等である。特に、増殖促進効果の点から、ラミナリトリオース及び/又はラミナリテトラオースを

させることが出来、エンド型の β -1,3-グルカナーゼのみを得ることが可能であるのでより好ましいが、これに限定されるものではない。

尚、ストレプトマイセス・エスピー-DIC-108の菌学的性質については、特開昭59-17996号公報に既に記載されているが、詳細には以下の様な性質を有するものである。

[ストレプトマイセス・sp.DIC-108 の菌学的性質]

(1) 形態的特徴

使用した培地 (ISP 培地を含む) 上での栄養菌系の生育は優れており、アンプル無機塩、オートミール寒天、イースト麦芽寒天培地上で豊富な気菌糸を形成する。

孢子形成気菌糸は直状又は直曲状である。孢子は楕円体で大きさは、短径×長径 $0.7 \sim 0.8 \mu \times 1.0 \sim 1.2 \mu$ である。走査型電子顕微鏡による観察では孢子の表面構造はイボ状 (Warty) である。

(2) 各種培地における生育状態

1) シュクロース硝酸塩寒天培地 (37℃)

薄茶色の基生菌糸状に灰色の気菌糸を形成し、溶解性色素は認められない。

2) グルコース・アスパラギン寒天培地 (37℃)

薄黄白色の生育で気菌糸の形成はみとめられない。また溶解性色素は認められない。

3) グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP 培地 - 65 37℃)

薄黄色の生育で気菌糸の着生はみとめられない。

験では、30℃～50℃で生育するが、至適温度は37℃～45℃である。

2) セラチンの液化：陰性

3) 脱脂乳の凝固及び

脱脂乳のペプトン化：陰性

4) メラニン色素の生成 (ペプトン・イースト・鉄寒天培地、ISP 培地 6)：陰性

5) テンブンの分解性：陽性 (分解ゾーンに白いリングを形成)

6) 炭素源の利用性 (プリドハム、ゴドリーブ寒天培地 - 9、37℃)

D-グルコース、L-アラビノース、D-キシロース、D-フルクトース、イノシトール、L-ラムノース、D-マンニトール、ガラクトースをよく利用して生育し、シュクロース、ラフィノース、サリシンは利用しない。

7) 細胞壁組成

ISP に記載されている糖組成 Type としては Type I に属する。

尚、本菌株は、工業技術院微生物工業技術研究

又、溶解性色素は認められない。

4) スターチ・無機塩寒天培地 (ISP 培地 37℃)

無色の発育上に緑灰色の気菌糸を着生し、溶解性色素は認められない。

5) チロシン寒天培地 (ISP 培地 - 7、37℃)

薄茶色の発育上に培養 7 日目では気菌糸は着生せず、14 日目まで白灰色の気菌糸を着生する。溶解性色素は認められない。

6) 栄養寒天培地 (37℃)

緑灰黒色の発育上に薄緑灰色の気菌糸を着生し、溶解性色素は認められない。

7) イースト麦芽寒天培地 (ISP 培地 - 2、37℃)

薄茶色の生育上に薄緑灰色の気菌糸を着生する。水溶性色素の生成は認められない。

8) オートミール寒天培地 (ISP 培地 - 3、37℃)

無色の生育上に緑茶灰色の気菌糸を着生し、水溶性色素の生成は認められない。

(3) 生理的性質

1) 生育温度範囲

酵母エキス・麦芽エキス液体培地による生育試

所に寄託申請し、微工研菌第 6593 号として受託されている。

本発明による酵素生産のための培養には、通常の固体培地又は液体培地が使用され、液体培養のための培地の炭素源としては、 β -1,3-グルコシル糖化合物であれば利用できる。

例えば、カードラン、パキマン、ラミナリン、リケナン、酵母細胞壁又はその部分加水分解物、リュウコシン、カロース、パラミロン等が挙げられ、又窒素源としては硫酸、塩安、リン安、硝酸ナトリウム、尿素、ペプトン、カゼイン等、有機窒素、無機窒素、いずれも利用できる。

天然栄養源としては、例えば各種糖蜜、コーンステイプリカー、オートミール、味液、魚粉、肉エキス、酵母、酵母エキス、ポテトエキス、麦芽エキス等があげられる。

無機物としては、例えばリン酸二カリウム、リン酸一ナトリウム、硫酸マグネシウム、微量金属類などが挙げられる。その他、必要に応じてビタミン類等を添加することもできる。これらの使用

濃度としては、0.1～40重量%が用いられる。また酸酵中の発泡を抑制するため、0.0001～1.0重量%の消泡剤を添加してもよい。消泡剤としては、シリコーン、大豆油など通常の消泡剤を用いる。

培養方法は、振とう培養、通気培養などの好気的液体培養が適しており、pH 5.0～8.0、培養温度20℃～50℃で1～6日、望ましくはpH 6.5～7.5、35～40℃で2日前後培養する。

エンド型の β -1,3-グルカナーゼは、菌体外に生産する酵素であるので、培養終了後、ろ過又は遠心分離して除菌し、上清液を回収する。そして必要に応じて濃縮し、硫酸、硫酸ナトリウムによる塩析、又はアセトン、エタノール、メタノール、イソプロパノールなどの有機溶剤を加え、酵素を沈殿物として取得し、乾燥、保存する。

本発明で好ましく用いられる前記DIC-108株からのエンド型 β -1,3-グルカナーゼの性質を次に示す。

エンド型 β -1,3-グルカナーゼ

バッファ、pH 7.5)を行ない食塩濃度0.2 Mで溶出される画分を集める。そして脱塩後CM-Sephadex C-25カラムクロマトグラフィー(0.01 M酢酸バッファー、pH 6.0)を行って未吸着画分を集め、再度DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィー(0～0.25 Mのリニアグラディエント)により活性画分を集める。次いでG-100ゲルろ過クロマトグラフィーにより、ほぼ均一な酵素タンパク質を得る。

(6) 分子量：

セファデックスG-100ゲルクロマトグラフィーによる分子量は約27,000と推定された。

次にエンド型 β -1,3-グルカナーゼを用いてラミナリオリゴ糖を製造する方法について説明する。

β -1,3-グルコシル糖化合物を濃度約0.1～約30重量%、pH 2～pH 10、好ましくはpH 5～pH 7の水溶液又は緩衝液にて懸濁し、エンド型 β -1,3-グルカナーゼを1g当たり100～200単位添加し、反応温度20℃～70℃、好ましく

(1) 作用

β -1,3-グルコシル糖化合物、例えばカードラン、ラミナリン、パキマン、酵母細胞壁及びその部分分解物に作用してエンドタイプの加水分解作用を示す。G₅(ラミナリペンタオース)を基質とした時の主分解生成物はG₂とG₃である。(図-1, 2参照)

(2) 作用pH範囲及び最適作用pH：

pH 3～9の範囲で作用し、最適作用pHは6付近にある。(図-3参照)

(3) 作用温度範囲及び最適作用温度：

約20℃～約70℃まで作用し、最適作用温度は約65℃である。(図-4参照)

(4) 熱安定性：

0.1 Mリン酸緩衝液(pH 6.0)中、1時間の熱処理により活性は、約50%低下した。

(5) 精製方法：

本酵素は、培養ろ過液から硫酸65%飽和で沈殿物として回収後、DEAE-Sephadex A-25カラムクロマトグラフィー(0.01 M トリス-HCl

は40℃～60℃で15分～24時間、好ましくは2時間～8時間攪拌しながら反応させる。尚ここで言うエンド型 β -1,3-グルカナーゼ活性の1単位とは、0.01 Mのリン酸バッファー(pH 6.0)にカードラン1重量%を懸濁させ、それに適量の酵素を加えて水で5.0 mlとし、45℃で反応させる。この条件で1時間に1mgのグルコースに相当する還元力を生成する酵素量を言う。

反応後、未分解の β -1,3-グルコシル糖化合物は、プフナーにてろ過又は遠心分離にて除き、上清は冷蔵庫内又は0～10℃の条件下で少なくとも一昼夜放置すると、G₆以上の可溶性ラミナリオリゴ糖は大部分が白色沈殿物として取り出すことができる。

こうして得られた上清を濃縮乾燥又は凍結乾燥するとG₂～G₅のラミナリオリゴ糖の白色粉末を得ることができる。又、目的に応じて活性炭カラムにより各糖を単離することももちろん任意に行いうる。

(発明の効果)

本発明のラミナリオリゴ糖は、ビフィズス菌に対して以下に述べる試験結果が示すように、ラミナリオース、ラミナリトリオース及びラミナリテトラオースといったラミナリオリゴ糖の単独はもちろんのこと、それらを含有したラミナリオリゴ糖組成物においても優れた増殖促進効果を示すものである。

とくにラミナリトリオース、ラミナリテトラオースは大腸菌等有害菌に対しては資化され難く、ビフィドバクテリウム菌に選択的な糖源として極めて有効である。

しかもラミナリオリゴ糖は、グルコースが β -1,3で直鎖的に結合したものである為、その構造上人体内で分解又は消化吸収されてその効力を失うことなく腸内に到達し、腸内のビフィズス菌に対して増殖効果を示すものと考えられる。

従って、飲食物(乳酸飲料、お菓子類)、薬剤、健康食品等に添加して用いることにより、ビフィドバクテリウム菌の高濃度維持が可能となる。

粗酵素(I)を0.01M酢酸バッファー(pH 5.0)にて溶解した(この時タンパク濃度を5mg/ml以下に調製する)溶液を栓付三角フラスコに入れトルエン一滴を加えて、45℃のウォーターバス中で一昼夜放置した。熱処理した酵素溶液中にはエキソ型 β -1,3-グルカナーゼ活性は全く見られず、エンド型 β -1,3-グルカナーゼ(II)が約25,000単位得られた。

②ラミナリオリゴ糖の調製

カードラン50gを0.01Mリン酸バッファー(pH 6.0)1.0Lにて懸濁させ、実施例1の①で得られた酵素(II)を200単位加えて45℃で2時間分解反応を行なった。

分解反応後の組成物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて分析したところ、 G_2 13.7%、 G_3 20.5%、 G_4 11.0%、 G_5 48.9%、 G_6 2.8%、 G_7 2.8%その他0.3%のラミナリオリゴ糖組成物(Ⅳ)(図-5参照)が得られた。

尚、HPLCによるラミナリオリゴ糖の分析は

尚、本発明によるラミナリオリゴ糖のビフィドバクテリウム菌に対する増殖促進効果は、ビフィドバクテリウム菌の種類とほとんど関係なく、例えば、ビフィドバクテリウム・ブリーベ、同ビフィダム、同インファンティス、同アドレスセンテイス等、すべての人腸内定着ビフィドバクテリウム菌で共通して優れた増殖効果を示すものである。

次に具体的な実施例を示して詳しく説明する。

文中〔%〕は重量基準であるものとする。

実施例 1

①エンド型 β -1,3グルカナーゼの調製

ストレプトマイセス・sp.DIC-108(微生物研究第6593号)を酵母エキス0.2w/v%、ポリペプトン0.2w/v%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1w/v%、 K_2HPO_4 0.2w/v%、からなる培地35Lに接種し、同時に別殺菌したカードラン350gを加えて70L Jarにて35℃で40時間通気攪拌培養した。得られた培養液23Lを遠心分離してその上清液を硫酸0.65飽和で塩析し、エンド型 β -1,3グルカナーゼ活性を含有した粗酵素製品(I)を得た。

分離条件

カラム: Licrosorb-NH₂ 5 μ m
 溶媒: アセトニトリル: 水(60:40)
 流速: 1.5 ml/min
 温度: 30℃

で行なった。

実施例 2

実施例1の②と全く同じ反応条件で、分解時間を8時間行なった後、反応液は活性炭カラム(Vol. 1,000ml)を通加させた。カラムを水5Lにて水洗後、50% EtOH 10Lで脱着させ、脱着液をエバポレーターにて濃縮後、凍結乾燥させた。得られた白色粉末をHPLCにて分析したところ、 G_2 48.7%、 G_3 48.9%その他2.4%からなるラミナリオリゴ糖(N)(図-6参照)が得られた。

試験例 1

供試菌株としてビフィドバクテリウム属菌ではビフィドバクテリウム ブレーベ(Bifidobacterium breve)、ビフィドバクテリウム ビフィダム(B. bifidum) ATCC 15696、ビフィドバクテリウム

アドレスセンティス (*B. adolescentis*) ATCC

15703を用いた。比較菌株としてはラクトバシルス カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ストレプトコッカス フェカリス (*Streptococcus faecalis*)、大腸菌として *Escherichia coli* JC-2、*E. coli* IFO-12734、及び *E. coli* IFO-3543を用いた。

試験方法としては矢沢らの方法 (Chem. Pharm. Bull. 26(11)3306-3311('78)) に準じて行なった。

既ち、各菌に対するそれぞれの2倍濃度の培地を高圧滅菌し、別に高圧滅菌した糖溶液を同容量加え、静置培養にて37℃で1~4日間培養した。その培養液をよく混和し、650nmにおける吸光度(濁度)を測定した。

結果を表-1に示した。

試験に用いたラミナリオリゴ糖(Ⅳ)はとくに大腸菌に対して発酵され難く、糖濃度を高めることにより、ビフィズス菌に対する増殖促進効果は大きくなった。

試験例2

ラミナリオリゴ糖(Ⅳ及びⅥ)より各オリゴ糖を単離し、前記したビフィドバクテリウム菌の混合物と大腸菌の利用性について検討した。

図-7に示したように、ラミナリトリオースが最も大腸菌を増殖させないで、ビフィドバクテリウム菌を増殖させることができる、即ち選択性に優れたラミナリオリゴ糖であり、ビフィドバクテリウム菌の増殖物質として優れたものであることが認められた。

4. 図面の簡単な説明

図-1はラミナリペンタオースの高速液体クロマトグラフィー(HLC)のチャートを示し、図-2は、ラミナリペンタオース溶液にエンド型 β -1,3-グルカナーゼを作用させた後のHLCチャートを示す。図-3はエンド型 β -1,3-グルカナーゼの作用pHと活性との関係を示すグラフであり、図-4は、同グルカナーゼの作用温度と活性との関係を示すグラフである。図-5は、 β -1,3-グルコシル糖化合物(カードラン)にエンド型 β -

表-1 供試菌による各糖の利用度

糖	Bifido-bacterium	L. casei	St. faecalis	E. coli JC-2	E. coli IFO-12734	E. coli IFO-3543
グルコナーゼ	+	+	+	+	+	+
ラクトーゼ	+	+	+	+	+	+
ラミナリビオース	+	+	+	+	+	+
ラミナリトリオース	+	+	+	+	+	+
ラミナリオリゴ糖(Ⅳ)	+	+	+	+	+	+
ラミナリオリゴ糖(N)*	+	+	+	+	+	+

各糖濃度は0.1%, ただし*ラミナリオリゴ糖は0.5%とした。

1,3-グルカナーゼを2時間作用させた後の溶液のHLCチャートを示す。図-6は、同様にして β -1,3-グルカナーゼを8時間作用させた後の溶液のHLCチャートを示す。図-7は、 $G_2 \sim G_6$ のラミナリオリゴ糖に対するビフィドバクテリウム菌と大腸菌との増殖の程度を示すグラフである。

代理人 弁理士 高橋 勝利

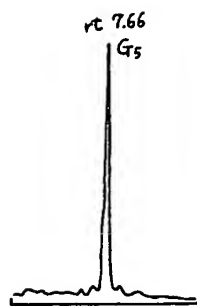


図-1

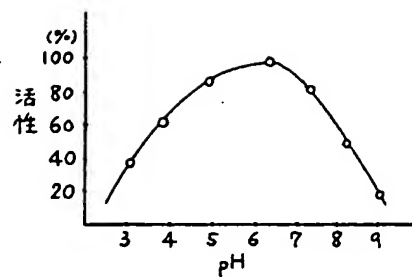


図-3

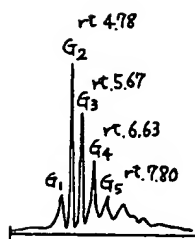


図-2

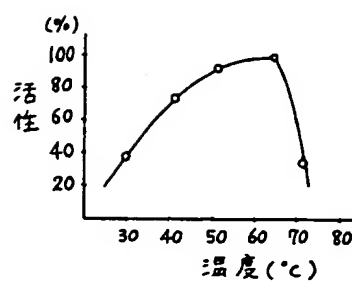


図-4

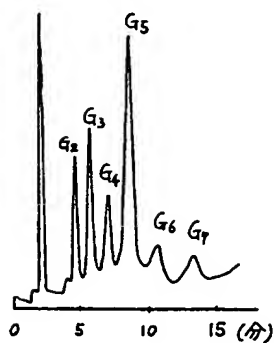


図-5

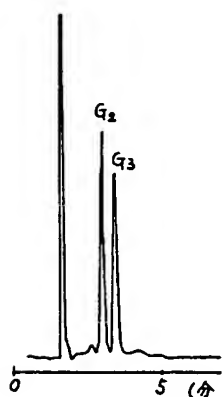


図-6

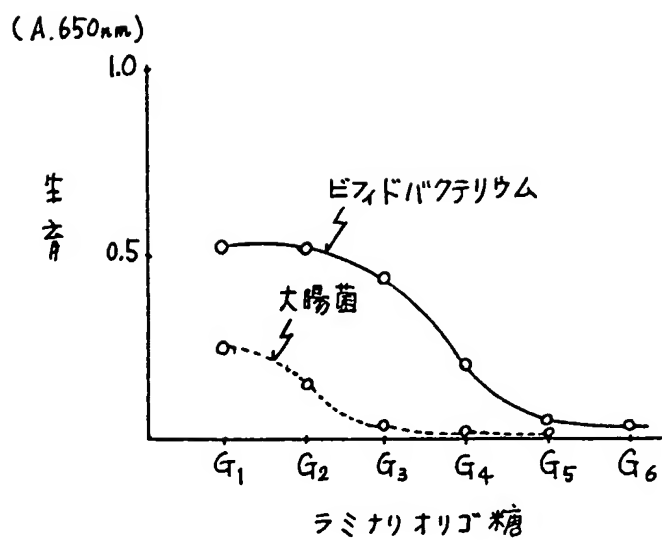


図-7